UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POLICLINIQUE DE MÉDECINE

FACULTÉ DE MÉDECINE
PROFESSEUR E. MARTIN

ACTIVITÉ INSULINIQUE DES FRACTIONS PROTÉINIQUES DU SÉRUM HUMAIN NORMAL

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR
RAYMOND CUENDET
DE
GENÈVE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE N° 2896

1963

PARIS
EXPANSION
— ÉDITEUR —
1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545903_0031

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POLICLINIQUE DE MÉDECINE

FACULTÉ DE MÉDECINE
PROFESSEUR E. MARTIN

ACTIVITÉ INSULINIQUE DES FRACTIONS PROTÉINIQUES DU SÉRUM HUMAIN NORMAL

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR
RAYMOND CUENDET
DE
GENÈVE

THÈSE N° 2896

PARIS
EXPANSION
— ÉDITEUR —
1964

La Faculté de médecine, sur préavis de M. le professeur E. MARTIN, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 juillet 1963

Le doyen :

Jean-Jacques MOZER

Thèse n° 2896

Ce travail a été effectué dans le laboratoire d'endocrinologie clinique (Dir. Prof. Dr E. F. PFEIFFER) de la 1re Clinique Universitaire de Médecine de Francfort sur le Main (Dir. Prof. Dr F. HOFF).

Extrait de *Pathologie-Biologie,* 1964, Vol. 12, N° 3-4, 148-160.

Que le professeur E. F. PFEIFFER trouve ici l'expression de notre reconnaissance pour avoir permis la réalisation de ce travail. Nous le remercions de la sollicitude dont il a toujours témoigné à notre égard.

Toute notre vive gratitude va au docteur H. DITSCHUNEIT, qui nous a suggéré le sujet de cette thèse et auprès duquel nous avons trouvé un appui constant.

Nous exprimons nos sincères remerciements au professeur E. MARTIN pour nous avoir envoyé à la première clinique universitaire de Francfort sur le Main, où nous avons pu effectuer ce travail.

A MES PARENTS

A MA FEMME

ACTIVITÉ INSULINIQUE DES FRACTIONS PROTÉINIQUES DU SÉRUM HUMAIN NORMAL

R. CUENDET

INTRODUCTION

L'INSULINE, hormone formée de 51 acides aminés, agit sur l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, selon un mécanisme encore mal connu aujourd'hui. Elle est la seule hormone à être sécrétée dans la circulation porte, et le rôle du foie dans son métabolisme n'est pas encore élucidé. Le taux de la glycémie est l'agent régulateur de la sécrétion pancréatique de l'insuline, il est probable cependant que la régulation du métabolisme glucidique par l'insuline ne se fait pas seulement par des variations de sa sécrétion, mais également par l'intervention d'un mécanisme périphérique permettant l'activation d'une forme inactive d'insuline circulant dans le sang périphérique.

Dans ce travail, nous avons entrepris l'étude des formes de transport de l'insuline, de leur localisation dans les diverses fractions du sérum, ainsi que de leurs variations après l'action de facteurs stimulants connus, tels que l'absorption de glucose.

Dans ce but, nous avons séparé par électrophorèse les sérums de 10 individus ayant un métabolisme normal, avant et après l'absorption de glucose, de même qu'après adjonction d'insuline cristallisée de bœuf. Nous avons ensuite dosé « l'activité insulinique » des fractions protéiniques ainsi séparées, par la méthode biologique se basant sur l'oxydation du glucose par le tissu adipeux ou le diaphragme de rat.

MATÉRIEL

Le **sérum sanguin** est prélevé par ponction veineuse chez des individus jeunes ayant un métabolisme normal (étudiants et médecins de la clinique), 3 heures après un petit déjeuner équivalent à 50 gr. de H de C et 30 minutes après une absorption de 100 grammes de glucose. On laisse le sang se coaguler, puis le sérum est séparé par centrifugation et conservé à moins 20 degrés jusqu'à son utilisation.

L'Insuline ajoutée « in vitro » est de l'insuline de bœuf, recristallisée 4 fois, sans glucagon (Farbwerke Hoechst A.G. ; 27 U/mgr). Une solution de base de 50 U/ml est préparée chaque semaine et diluée « ex temporane » pour chaque expérience avec une solution d'HCl n/300.

L'insuline radioactive de bœuf marquée par l'I^{131} (Farbwerke Hoechst A.G.) a une activité spécifique de 10 microCuries par mgr d'insuline.

L'Antisérum anti-insuline de bœuf est préparé chez le cochon d'Inde par injection d'insuline de bœuf, additionnée d'adjuvant de Freund. L'émulsion a la composition suivante :

10 parties de solution aqueuse d'insuline de bœuf (20 U/ml)
8,5 parties de Bayol F (Esso),
1,5 parties d'Arlacel (Atlas Co).

A cette émulsion sont ajoutées 4 mgr/ml de mycobactéries tuberculeuses tuées à la première injection ; 3 mgr/ml à la seconde injection ; 2 mgr/ml à la troisième et 1 mgr/ml à la quatrième injection. Chaque animal reçoit 4 injections sous-cutanées de 1 ml d'émulsion à une semaine d'intervalle. Le sang est récolté 14 jours après la dernière injection par ponction cardiaque. Le sérum obtenu par centrifugation est conservé à moins 20 degrés. Les dilutions ultérieures sont faites « ex temporane » avec une solution tampon de Krebs-Ringer.

Solutions tampons :

a) La solution tampon de Krebs-Ringer a un pH de 7,4 après barbotage pendant 5 minutes par du Carbogène (5 % CO_2, 95 % O_2). Sa composition est la suivante : (20)

100 ml 0,154 M NaCl
21 ml 0,154 M $NaHCO_3$
4 ml 0,154 M KCl
1 ml 0,154 M KH_2PO_4
3 ml 0,110 M $CaCl_2$
1 ml 0,154 M $MgSO_4$

Ces solutions sont préparées avec de l'eau distillée 2 fois dans un appareil à électrodes de quartz. Pour l'électrophorèse préparative de zone, on utilise une solution tampon de Krebs-Ringer diluée (1 : 3), sans Biphosphate de K et sans effectuer de barbotage par du Carbogène. On obtient ainsi un pH de 7,8.

b) Une solution tampon de Véronal sodé ayant un pH de 8,6 et une force ionique de 0,1 est utilisée pour l'électrophorèse sur papier et pour l'électrophorèse préparative de zone avec insuline marquée à l'I^{131}.

Le **milieu** utilisé pour la séparation de sérum par électrophorèse préparative de zone est un chlorure de polyvinyle : le Géon X 427 (Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg). Il se présente sous la forme d'une poudre blanche qui, mélangée à une solution tampon, forme une bouillie homogène. Une poudre semblable est également utilisée avec succès par Heide, Haupt et Schmiedtberger pour la séparation de 20 à 40 ml de sérum (21). La poudre de polyvinyle est lavée, après la séparation 3 à 4 fois avec de l'eau distillée et réutilisée.

TECHNIQUES

ELECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE DE ZONE.

La technique utilisée est basée sur celle décrite par Kunkel et Slater (24). A la place d'amidon, nous utilisons comme milieu de support de l'électrophorèse une poudre de chlorure de polyvinyle. En outre, un système de refroidissement du milieu électrophorétique a été adapté pour éviter la dénaturation de l'insuline par la chaleur produite par le courant. Ce refroidissement doit être aussi uniforme que possible, car une différence de température de quelques degrés Centigrade dans l'épaisseur du bloc de chlorure de polyvinyle suffit pour que les protéines ne migrent plus à la même vitesse à sa surface qu'à sa base. Dans ce but, nous avons fait reposer le bloc de chlorure de polyvinyle sur une plaque de verre refroidie par un système réfrigérant de type commercial, la surface supérieure du bloc étant recouverte par une plaque de verre refroidie par un bac contenant de la glace (fig. 1). On parvient

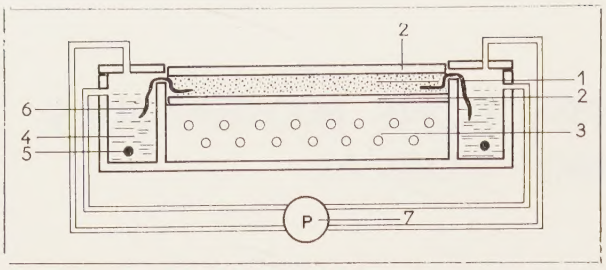


FIG. 1. — Appareil pour électrophorèse préparative de zone.
1. Bloc de chlorure de polyvinyle.
2. Plaque de verre.
3. Système de refroidissement.
4. Compartiment des électrodes.
5. Electrode de platine.
6. Electrode de contact (tissu).
7. Pompe pour le mélange de la solution tampon.

ainsi à maintenir une température uniforme, toujours inférieure à 5 degrés Centigrade.

La préparation du milieu électrophorétique se fait de la manière suivante : on mélange la poudre de chlorure de polyvinyle avec la solution tampon de Krebs-Ringer, de façon à obtenir une bouillie homogène que l'on étend ensuite sur la plaque de verre délimitée par un cadre de plastic de 12 mm d'épaisseur et de 60 cm de long sur 40 cm de large. On enduit au préalable cette plaque d'une fine couche de Silicone pour diminuer la tension superficielle du verre. Au moyen d'une règle de bois, on enlève l'excédent de bouillie pour obtenir un bloc de polyvinyle de 12 mm d'épaisseur, ayant une surface parfaitement plane.

On attend une demi-heure que le liquide en excès de la bouillie vienne à la surface et que le milieu se refroidisse. Le liquide surnageant est ensuite absorbé au moyen de feuilles de papier filtre. On obtient ainsi un bloc de chlorure de polyvinyle tout à fait homogène, contenant environ 40 % de solution tampon de Krebs-Ringer. On creuse au moyen d'une spatule un sillon de section triangulaire ayant 1 cm de côté dans toute l'épaisseur du bloc, au tiers de sa longueur et sur toute sa largeur.

Dix ml. de sérum, mélangés avec de la poudre de chlorure de polyvinyle pour former une bouillie, sont coulés dans le sillon préparé. Le sérum employé doit être dialysé avant la séparation pendant 8 à 10 heures dans une solution de Krebs-Ringer, afin qu'il s'établisse un équilibre ionique entre les deux solutions. La préparation terminée est recouverte par une seconde plaque de verre qui doit être en contact direct avec la surface de la bouillie. On place par-dessus un bac rempli de glace et l'on attend une demi-heure que le refroidissement soit uniforme et inférieur à 5 degrés Centigrade pour enclencher le courant électrique. La tension électrique doit être de 4,5 Volts par cm. et l'on obtient ainsi un courant de 150 milliampères. La durée de la séparation est de 20 heures environ, temps pendant lequel une pompe mélange constamment la solution tampon des 2 compartiments des électrodes pour éviter les changements de pH.

ELUTION DES PROTÉINES.

La séparation terminée, on enlève la plaque de verre supérieure en la glissant parallèlement au sillon. On peut alors facilement distinguer, à la surface du bloc de chlorure de polyvinyle, une bande jaune représentant les albumines et une bande brun orangé représentant les β-globulines. Pour connaître avec précision les limites entre les différentes fractions protéiniques, on a recours à la coloration des protéines. Dans ce but, on dépose à la surface du milieu électrophorétique une bande de papier filtre, afin qu'elle s'imprègne des protéines fractionnées. Cette empreinte, colorée dans une solution de Noir d'Amido, suivant la technique décrite plus loin pour l'électrophorèse sur papier, permet de distinguer 4 fractions protéiniques. Une courbe d'extinction de cette empreinte colorée est obtenue au moyen d'un appareil automatique Spinco Analytrol (Beckman, USA). La surface de cette courbe exprime le taux relatif des protéines des fractions sériques.

Le bloc de polyvinyle est divisé d'après l'empreinte au moyen d'une spatule, en 4 parties, chacune contenant une des fractions protéiniques. On procède alors à l'élution des protéines en versant 100 ml. d'HCl n/300 sur chaque fraction mise dans un entonnoir muni d'un filtre fin de nylon. Le produit d'élution est centrifugé pour être débarrassé de la poudre de polyvinyle qui a passé à travers le filtre. Ces opérations sont effectuées en chambre froide (8 degrés C) pour éviter la dénaturation de l'insuline.

La dilution des fractions protéiniques ainsi éluées étant trop élevée pour doser l'insuline, on leur fait subir une lyophilisation. Les 4 fractions protéiniques une fois séchées sont dissoutes dans 10 ml de solution tampon de Krebs-Ringer, c'est-à-dire dans le même volume que le sérum employé pour la séparation.

Ce procédé d'élution entraîne une perte importante de protéines. Pour connaître cette perte, nous avons fait à cinq reprises une détermination de l'azote protéinique du sérum original et des différentes fractions par la microméthode de Kjehldahl (*). Nous avons pu constater une perte de protéines allant de 47 à 55 %, équivalente dans chaque fraction.

Ayant toujours séparé la même quantité de sérum et travaillant toujours dans les mêmes conditions, nous n'avons pas remarqué de variations importantes de la perte des protéines. Nous avons donc adopté une valeur moyenne de 50 % pour cette perte et nous avons multiplié par 2 les taux d'activité insulinique mesurés lors de nos séparations ultérieures.

Avant de tester biologiquement l'activité insulinique des fractions, il s'est révélé nécessaire de neutraliser chaque fraction avec une solution de biphosphate de K, de façon à obtenir un pH de 7,4 (mesures faites avec un pHmètre à électrode de verre : Kuntze, Dusseldorf). Ces fractions doivent encore être identifiées et leur pureté contrôlée par électrophorèse sur papier.

ELECTROPHORÈSE SUR PAPIER.

Le support utilisé pour la séparation est une bande de papier filtre (Bender et Hobein Nr 2043a), le milieu est la solution tampon de véronal sodé. La séparation est faite dans un appareil à électrophorèse horizontal d'après Grassmann et Hannig (19) avec une tension de 4,5 Volts/cm, pendant 14 h.

Les bandes de papier filtre sont plongées dans la solution tampon, puis étendues sur une feuille de papier buvard qui absorbe l'excès de solution. Les bandes ainsi humidifiées sont placées horizontalement sur un cadre de plexiglas. On dépose sur les différentes bandes de papier filtre, au moyen d'un tube capillaire, environ 0,03 ml de chacune des fractions à contrôler et 0,01 du sérum original. On pourra ainsi, par comparaison, identifier les fractions protéiniques et contrôler leur pureté. Le cadre de plexiglas supportant les papiers filtres est placé dans l'appareil à électrophorèse de manière à ce que chacune des extrémités des papiers filtres plonge dans la solution tampon des compartiments à électrodes.

Un couvercle est mis en place pour éviter l'évaporation. On laisse le courant agir pendant 14 heures. Les bandes de papier sont ensuite séchées au four, puis colorées pendant 10 minutes dans une solution d'alcool méthylique (90 %) et d'acide acétique (10 %) saturé de Noir d'Amido 10 B (Merk A.G., Darmstadt). La décoloration est effectuée pendant trois quarts d'heure dans trois bains d'alcool méthylique et d'acide acétique de concentrations différentes (800, 600, 400 ml d'alcool méthylique, 100 ml d'acide acétique glacial ad 1000 ml d'eau distillée).

ELECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE DE ZONE, AVEC ADDITION D'INSULINE-I^{131} ET SON DOSAGE.

On sépare par la technique de l'électrophorèse préparative sur milieu de chlorure de polyvinyle, décrite précédemment, 5 ml de sérum d'individu ayant un métabolisme normal. On ajoute à ce sérum, in vitro, avant la séparation, 0,02 μC/ml d'insuline-I^{131} équivalent à 50 μU/ml.

A la place de la solution tampon de Krebs-Ringer modifiée (pH 7,8), on utilise une solution tampon de véronal sodé (pH = 8,6) qui permet une meilleure séparation.

Le dosage de l'insuline-I^{131} se fait par le comptage de la radioactivité d'échantillon de volume constant (environ 1 ml) prélevé tous les deux centimètres dans le bloc de chlorure de polyvinyle. Leur radioactivité est déterminée au moyen d'un compteur à scintillation à cristal foré.

(*) La détermination de l'azote selon Kjehldahl a été obligeamment faite dans le laboratoire de la première clinique de médecine de Francfort-sur-le-Main, (Directeur Pr Dr M. FISCHER).

Dosage biologique de l'activité insulinique « in vitro ».

A) *Au moyen du tissu graisseux du rat.*

La méthode est basée sur la capacité de l'insuline de stimuler l'oxydation du glucose-1-C^{14} par la graisse épididymaire du rat (11, 28, 29, 39). Nous utilisons cette méthode modifiée, telle qu'elle est décrite par Ditschuneit, Faulhaber et Pfeiffer (9).

On emploie des rats albinos, nourris ad libitum, d'un poids de 140 à 170 grammes (Elevage S. Ivanovas Kissleg, Allemagne). Après avoir sacrifié l'animal, on ouvre sa cavité abdominale pour prélever trois fines languettes de tissu graisseux se trouvant au niveau de l'épididyme de chaque testicule. Chacune des languettes de graisse, ayant un poids de 50 mg environ, est immédiatement plongée dans un flacon contenant un milieu d'incubation. Chaque flacon à incubation est ensuite fermé par un bouchon de verre, ayant une ouverture obturée par une membrane de caoutchouc permettant l'introduction d'aiguilles à injection par lesquelles on fait passer un courant de carbogène (95 % O_2 et 5 % CO_2) pendant 5 minutes. On pèse chaque flacon à incubation avant et après l'introduction du tissu graisseux pour connaître son poids. L'incubation se fait dans un bain agité, à 37 degrés pendant deux heures.

On injecte ensuite au moyen d'une seringue à tuberculine munie d'une longue aiguille 0,2 ml. d'hydroxyde d'hyamine (en solution molaire dans l'alcool méthylique) dans une cupule de plastic suspendue sous le bouchon par un crochet. On injecte immédiatement après, de la même manière 0,3 ml d'acide sulfurique n/1 dans le milieu d'incubation pour déplacer le CO_2 formé par l'oxydation du glucose par le tissu graisseux.

On attend une heure pour que l'hydroxyde d'hyamine absorbe le CO_2 dégagé. On ouvre alors les flacons à incubation et l'on décroche la cupule contenant le CO_2 pour la mettre dans un autre flacon contenant 2 ml d'alcool absolu et 12 ml de liquide à scintillation qui a la composition suivante :

0,2 Phényloxazolyl-Benzol (POPOP)
0,4 Diphényloxazol (POP)
ad 100 Toluol.

Le comptage des rayons β mous émis par le Carbone^{14} est effectué par un compteur à scintillation liquide semi-automatique (LSC-10 B, Tracelab, USA).

Sur chaque rat, il est possible de prélever six languettes de tissu graisseux épididymaire qui sont utilisées pour six dosages. Chaque dosage est effectué au moyen de 3 languettes de graisse provenant de 3 animaux différents. Dans une série de 6 dosages, deux d'entre eux, appelés standard, sont effectués avec une quantité déterminée d'insuline cristallisée (1.000 μU/ml et 62,5 μU/ml), diluée dans une solution tampon de Krebs-Ringer. Les 4 derniers dosages permettent de déterminer l'activité insulinique de 4 fractions sériques.

Chaque milieu d'incubation doit avoir un volume total de 2 ml et une concentration de glucose de 250 mgr %. Dans ce but, on pipette 1 ml de sérum fractionné, 0,9 ml de solution tampon de Krebs-Ringer contenant 500 mgr % de glucose et 0,1 ml de glucose marqué au Carbone^{14} en C^1, ayant une radio-activité de 0,4 μC/ml (Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England).

L'activité insulinique est donc toujours exprimée en μU d'insuline par ml de fraction protéinique diluée dans un rapport de 1 : 2.

Calculs : Les résultats sont calculés en impulsions par minute par mg de tissu graisseux. Il existe, entre la concentration d'insuline exprimée en μU/ml et son activité biologique mesurée en impulsions par min. par mg. de graisse, une relation exponentielle qui peut être représentée graphiquement par une droite si l'on reporte sur l'axe des ordonnées la racine carrée de l'activité biologique et sur l'axe des abscisses le logarithme de la concentration de l'insuline.

Pour chaque série de 6 dosages, on trace une telle droite qui exprime la régression linéaire de l'activité biologique des 2 standards (1.000 et 62,5 μU/ml). Cette droite permettra ainsi de convertir les résultats calculés en impulsions par min., par mgr de graisse en micro-unités d'insuline par ml. Chaque fraction sérique est dosée deux fois dans deux séries de dosages différents.

B) *Au moyen du diaphragme de rat.*

La méthode est basée sur la capacité de l'insuline de stimuler l'absorption du glucose par le diaphragme de rat isolé « in vitro » (10).

On utilise les mêmes rats que précédemment, qui cependant ont été mis à jeun depuis 24 heures. Après avoir sacrifié les animaux, on ouvre leur cavité abdominale et l'on dissèque soigneusement le diaphragme en deux parties égales. Un hémidiaphragme est incubé dans 0,75 ml de fraction protéinique additionnée de 0,75 ml de solution tampon de Krebs-Ringer contenant 500 mgr % de glucose, tandis que l'autre hémi-diaphragme est incubé dans 1,5 ml de solution tampon de Krebs-Ringer. Les milieux d'incubation doivent avoir un volume total de 1,5 ml et un taux de glucose de 250 mgr %.

Les flacons à incubation sont fermés au moyen de bouchons du même modèle que ceux utilisés précédemment, permettant de faire passer un courant de Carbogène.

Après deux heures d'incubation dans un bain à 37 degrés, on prélève dans chaque verre à incubation 0,2 ml du milieu pour doser le taux du glucose par la méthode enzymatique de Huggett et Nixon, au moyen des réactifs de Boehringer (Biochemica Boehringer Test, Mannheim). Les diaphragmes sont séchés à la chaleur (110 degrés) et pesés secs. Ayant dosé le taux du glucose avant et après l'incubation, on calcule son absorption en γ pour 10 mgr de diaphragme sec. On soustrait ensuite l'absorption du glucose de l'hémidiaphragme incubé dans la solution tampon de Krebs-Ringer de l'absorption de celui qui a été incubé dans le sérum à tester. On obtient ainsi l'absorption nette de glucose par mgr de diaphragme incubé dans un sérum dilué (1 : 2).

RÉSULTATS

L'électrophorèse préparative de zone utilisant un milieu de support de chlorure de polyvinyle et une solution tampon de Krebs-Ringer modifiée (pH = 7,8) permet une très bonne séparation de 10 ml de sérum en 4 fractions protéiniques, comme le montre l'empreinte colorée et sa courbe d'extinction (fig. 2 A).

L'électrophorèse sur papier de ces 4 fractions, comparée à celle du sérum original, permet de les identifier et de contrôler leur pureté (fig. 2 B).

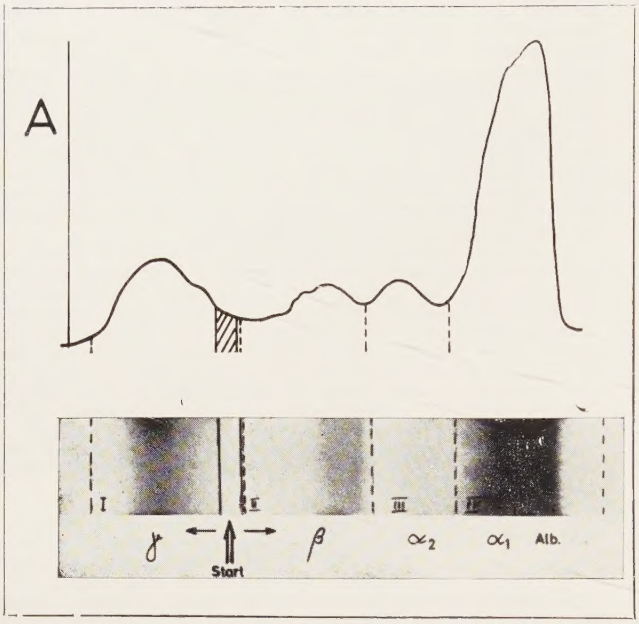
La migration de la fraction I est identique à celle des γ-globulines du sérum original ; de même, la fraction II s'identifie avec les β-globulines, la fraction III avec les α_2-globulines et la fraction IV avec les α_1-globulines et les albumines qu'il n'a pas été possible de séparer avec la solution de Krebs-Ringer utilisée.

On constate sur l'empreinte colorée que les β, α_2, α_1-globulines et albumines ont migré à droite, vers l'anode, tandis que les γ-globulines ont migré à gauche, vers la cathode. Cette migration vers la cathode des γ-globulines en pH alcalin est constatée également lors de l'électrophorèse utilisant d'autres milieux (Amidon, Agar). Elle est due à un courant endosmotique vers la cathode. L'importance de ce courant est fonction de la charge électrique que prend le milieu utilisé sous l'effet du courant électrique.

L'activité insulinique de chacune des fractions (diluées 1 : 2) a été mesurée par la méthode basée sur l'oxydation du glucose-1-C^{14} par le tissu graisseux épididymaire du rat.

Une première série de dosages des fractions protéiniques de 10 individus ayant un métabolisme normal a été fait, 3 heures après l'absorption d'un léger repas, soit environ 50 g de H de C (tableau II).

Nous trouvons dans chaque fraction une activité insulinique. Dans les γ-globulines, cette activité varie entre 110 et 700 μU/ml, dans les β-globulines, entre 390 et 1.600 μU/ml, dans les α_2-globulines, entre 20 et 215 μU/ml et dans les α_1-globulines-albumines, entre 155 et 600 μU/ml.



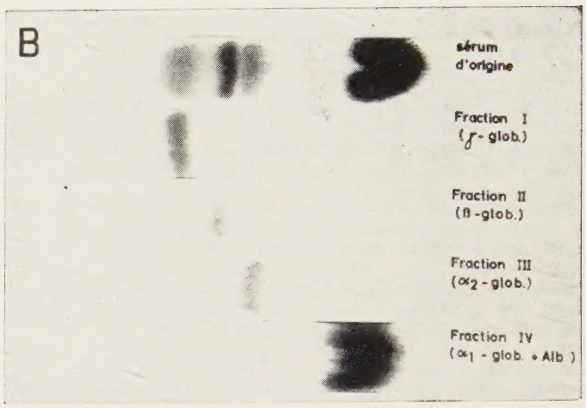


FIG. 2. — Représentation des fractions protéiniques d'un sérum séparé par électrophorèse de zone.

A. Empreinte colorée (papier filtre) et courbe d'extinction d'un sérum séparé par électrophorèse préparative sur un bloc de chlorure de polyvinyle (8 ml, 4,5 volts/cm., tampon de Krebs-Ringer, 20 heures).

B. Contrôle de la pureté des fractions protéiniques d'un sérum séparé par électrophorèse préparative sur un bloc de chlorure de polyvinyle.

Les moyennes de l'activité insulinique de chaque fraction et leur écart standard sont consignés dans le tableau I (fig. 3).

TABLEAU I

	μU/ml	%
γ-globulines	318 ± 192	20,9 ± 9,0
β-globulines	763 ± 303	51,8 ± 12,6
α_2-globulines	53 ± 68	3,1 ± 2,8
α_1-globulines albumines	353 ± 153	24,2 ± 9,1

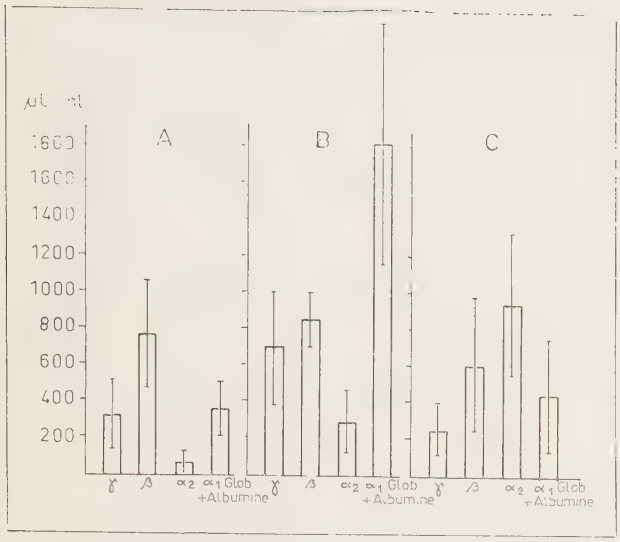
Dans la seconde colonne, nous avons inscrit les moyennes de l'activité insulinique, calculées en % de l'activité insulinique totale, ainsi que leur écart standard (fig. 4).

On constate que l'activité insulinique se localise principalement dans deux zones : premièrement dans les γ et β-globulines, qui représentent le 73 % de l'activité insulinique totale, et deuxièmement dans les α_1-globulines et albumines qui n'en représentent que le 24 %.

Les différences des moyennes de l'activité des β-globulines et des α_1-globulines-albumines se révèlent statistiquement significatives ($p < 0{,}001$), de même que la différence des moyennes des γ et β-globulines ($p < 0{,}001$).

TABLEAU II. — **Activité insulinique des fractions protéiniques du sérum d'individus ayant un métabolisme normal, 3 heures après absorption de nourriture (50 g. H. de C.)**

Nom	Activité insulinique des fractions protéiniques (μU/ml de sérum fractionné et dilué 1 : 2 ; % de l'activité totale)								
	γ-globuline		β-globuline		α_2-globuline		α_1-globuline albumine		Somme
	μU/ml	%	μU/ml	%	μU/ml	%	μU/ml	%	
R. H.	260	18,0	690	47,5	20	1,4	480	33,1	1450
R. G.	130	14,3	390	41,0	20	2,0	400	42,7	940
H. D.	270	20,5	710	53,0	30	2,0	330	24,5	1440
A. A.	700	35,7	630	42,2	35	1,7	600	30,4	1965
H. F.	340	24,0	730	50,8	20	1,2	350	24,0	1440
E. B.	455	29,0	910	58,0	20	1,2	180	11,8	1565
E. R.	110	13,3	505	63,9	20	2,8	155	19,4	790
R. R.	515	33,5	580	38,0	135	8,7	305	19,8	1535
B. D.	115	9,6	885	73,0	25	2,0	185	15,4	1210
H. K.	285	10,8	1600	60,5	215	8,1	540	20,6	2640
Moyenne	318	20,9	763	51,8	53	3,1	353	24,2	1488
Ecart standard	± 192	± 9,0	± 303	± 12,6	± 68	± 2,8	± 153	± 9,1	± 788
Valeur statistique γ-glob. β-glob.			$p < 0{,}001$				$p < 0{,}001$		



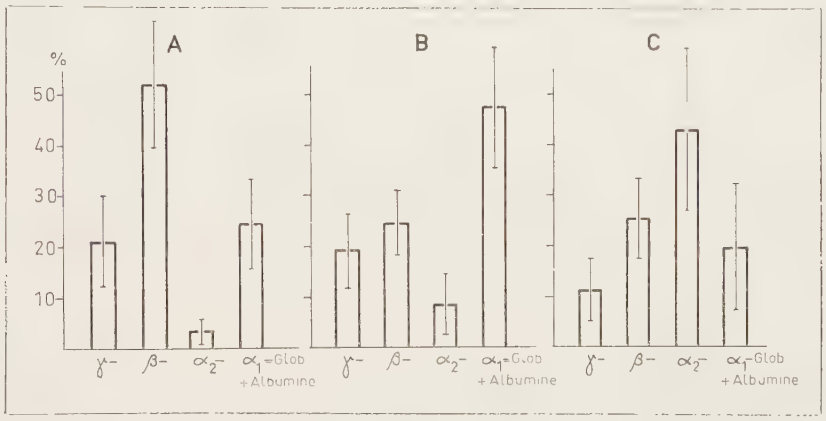
3

FIG. 3. — Activité insulinique (μU/ml de sérum fractionné, dilué 1:2) des fractions protéiniques de sérums séparés par électrophorèse préparative de zone chez des individus ayant un métabolisme normal.

(A) 3 heures après un léger repas (50 gr. de H. de C.).
(B) 30 minutes après absorption de 100 gr. de glucose
(C) Après addition d'insuline cristallisée (2.000 μU/ml) dans le sérum *in vitro* avant la séparation.

FIG. 4. — Représentation en % de l'activité insulinique des fractions protéiniques de sérums séparés par électrophorèse préparative de zone chez des individus ayant un métabolisme normal.

(A) 3 heures après un léger repas (50 gr. H. de C.).
(B) 30 minutes après absorption de 100 gr. de glucose.
(C) Après addition d'insuline cristallisée (1.000 μU/ml) dans le sérum *in vitro* avant la séparation



4

Nous avons fait une seconde série de dosages des fractions protéiniques (diluées 1 : 2) de sept des dix individus déjà testés, mais cette fois 30 minutes après l'absorption *per os* de 100 g de glucose (tableau IV).

L'activité insulinique varie dans les γ-globulines entre 230 et 1.080 μU/ml, dans les β-globulines, entre 700 et 1.090 μU/ml, dans les α_2-globulines, entre 90 et 700 μU/ml et dans les α_1-globulines-albumines, entre 690 et 3.300 μU/ml.

Les moyennes de ces valeurs et leur écart standard donnent les résultats que rapporte le tableau III.

TABLEAU III

	μU/ml	%
γ-globulines	700 ± 320	19,4 ± 7,9
β-globulines	846 ± 145	24,5 ± 6,5
α_2-globulines	293 ± 179	8,3 ± 6,2
α_1-globulines albumines .	1.790 ± 640	47,8 ± 12,1

Dans la seconde colonne, nous avons inscrit les moyennes de l'activité insulinique, calculées en % de l'activité insulinique totale, ainsi que leur écart standard (fig. 4).

On constate à nouveau une répartition de l'activité insulinique en 2 zones, représentées par les γ et β-globulines, et les α_1-globulines-albumines. Leur proportion n'est cependant plus la même, puisque les γ et β-globulines représentent le 44 % de l'activité insulinique totale, tandis que les α_1-globulines-albumines en représentent le 48 % (fig. 4).

La différence des moyennes de l'activité insulinique des β-globulines et des α_1-globulines-albumines est statistiquement significative ($p < 0{,}001$), ce qui n'est pas le cas pour la différence des moyennes des γ et β-globulines ($p < 0{,}2$).

Si l'on compare l'activité insulinique en valeur absolue (μU/ml) des fractions du sérum des individus testés « à jeun » (tableau II) à celle des fractions du sérum d'individus après absorption de 100 grammes de glucose (tableau IV), on constate une augmentation de 470 μU/ml dans les γ-β-globulines après absorption du glucose, ce qui n'est pas une augmentation statistiquement significative ($p < 0{,}2$) ; tandis qu'une augmentation de 1.440 μU/ml est remarquée dans les

TABLEAU IV. — **Activité insulinique des fractions protéiniques du sérum d'individus ayant un métabolisme normal, 30 minutes après absorption de glucose (100 g « per os »).**

Nom	Activité insulinique des fractions protéiniques (µU/ml de sérum fractionné et dilué 1:2 ; % de l'activité totale). γ-globuline µU/ml	γ-globuline %	β-globuline µU/ml	β-globuline %	α_2-globuline µU/ml	α_2-globuline %	α_1-globuline albumine µU/ml	α_1-globuline albumine %	Somme
R. H.	490	16,4	730	24,5	390	13,2	1.370	45,5	2,980
R. C.	855	35,1	750	30,9	135	5,5	690	28,5	2.430
H. D.	1.080	19,6	940	17,0	190	3,4	3.300	60,0	5.510
H. F.	1.060	22,6	765	17,2	410	9,2	2.270	51,0	4.505
E. B.	700	19,5	945	26,4	700	19,5	1.240	34,6	3.585
E. R.	480	15,8	700	22,8	135	4,4	1.750	57,0	3.070
R. R.	230	6,8	1.090	32,6	90	2,7	1.935	57,9	3.345
Moyenne	700	19,4	846	24,5	293	8,3	1.790	47,8	3.630
Ecart standard	± 320	± 7,9	± 145	± 6,5	± 179	± 6,2	± 640	± 12,1	
Valeur statistique : γ-globuline / β-globuline			p < 0,2				p < 0,001		

α_1-globulines-albumines, ce qui est une augmentation significative ($p < 0,001$). L'élévation de l'activité insulinique totale après absorption de 100 grammes de glucose est de 2.140 µU/ml.

Une troisième série de recherches a été effectuée chez huit des dix individus déjà testés « à jeun » (tableau II), en dosant l'activité insulinique des fractions protéiniques (diluées 1 : 2), après adjonction dans le sérum *in vitro,* avant la séparation, de 1.000 µU par ml de sérum d'insuline de bœuf cristallisée.

L'activité insulinique varie dans les γ-globulines entre 50 et 410 µU/ml, dans les β-globulines, entre 200 et 1.260 µU/ml, dans les α_2-globulines, entre 545 et 1.760 µU/ml et dans les α_1-globulines-albumines, entre 75 et 910 µU/ml (tableau VI).

Les moyennes de l'activité insulinique de chaque fraction et leur écart standard sont indiqués dans le tableau V (fig. 3) :

Dans la seconde colonne, nous avons représenté les moyennes de l'activité insulinique, calculées en % de l'activité totale et leur écart standard (fig. 4).

TABLEAU V

	µU/ml	%
γ-globulines	250 ± 149	11 ± 6
β-globulines	605 ± 362	26 ± 9
α_2-globulines	930 ± 386	43 ± 16
α_1-globulines - albumines	440 ± 300	20 ± 13

On constate que la zone de principale activité insulinique se localise dans les α_2-globulines, qui se distinguent des β-globulines par une différence d'activité de 330 µU/ml, ce qui est une valeur statistiquement significative ($p < 0,05$) et des α_1-globulines-albumines par une différence d'activité de 490 µU/ml, différence également significative ($p < 0,01$).

Si l'on compare les valeurs ci-dessus avec celles obtenues chez l'individu « à jeun » (tableau II), on remarque que les α_2-globulines ont subi une augmentation

TABLEAU VI. — **Activité insulinique des fractions protéiniques du sérum d'individus ayant un métabolisme normal, après addition « in vitro » de 1.000 µU/ml d'insuline de bœuf cristallisée avant la séparation du sérum.**

Nom	Activité insulinique des fractions protéiniques (µU/ml de sérum fractionné et dilué 1:2 ; % de l'activité totale) γ-globuline µU/ml	γ-globuline %	β-globuline µU/ml	β-globuline %	α_2-globuline µU/ml	α_2-globuline %	α_1-globuline albumine µU/ml	α_1-globuline albumine %	Somme
R. H.	50	3,5	200	13,8	1.120	77,5	75	5,2	1.445
R. C.	85	6,5	290	20,1	625	43,2	435	30,2	1.435
H. D.	295	13,1	500	22,2	545	24,1	910	40,6	2,250
A. A.	340	19,2	375	21,2	750	42,3	305	17,3	1.765
H. F.	410	14,3	540	19,2	1.020	36,0	865	30,5	2.835
E. B.	320	15,2	670	32,0	870	42,0	230	10,8	2.090
E. R.	400	15,4	1.000	38,5	750	28,8	450	17,3	2.600
R. R.	115	3,5	1.260	37,5	1.760	52,0	235	7,0	3.370
Moyenne	250	11,3	605	25,6	930	43,2	440	19.9	2.225
Ecart standard	± 149	± 6,0	± 362	± 9,2	± 386	± 16,4	± 300	± 12,7	± 678
Valeur statistique : γ-globuline / β-globuline			p < 0,01						
α_2-globuline					p < 0,05				
α_1-globuline							p < 0,01		

de 880 μU/ml, alors que l'on ne constate dans les α_1-globulines-albumines qu'une augmentation de 90 μU/ml qui n'est pas statistiquement significative et dans les γ et β-globulines, une diminution de 225 μU/ml, qui n'est pas non plus significative.

Ces résultats montrent que l'insuline de bœuf ajoutée au sérum *in vitro* avant la séparation migre avec les α_2-globulines.

La migration électrophorétique de l'insuline de bœuf a été également étudiée à l'aide d'insuline marquée par l'Iode 131. Cinq ml de sérum de trois individus ayant un métabolisme normal ont été séparés après adjonction *in vitro* de 0,02 μC/ml d'insuline I^{131} (soit 50 μU/ml) par électrophorèse préparative sur milieu de chlorure de polyvinyle (fig. 5).

Comme on peut le constater sur l'empreinte colorée et sa courbe d'extinction, l'utilisation d'une solution tampon de véronal sodé (pH = 8,6) a permis une meilleure séparation : les α_1-globulines se sont séparées des albumines.

Les taux de la radioactivité des échantillons prélevés tous les deux centimètres dans le milieu électrophorétique sont représentés dans le tableau de la figure 5. Ces valeurs représentées graphiquement forment une courbe de radioactivité ayant son sommet entre les α_1 et α_2 globulines. Cette courbe est asymétrique et montre une chute de la radioactivité nettement plus lente dans les α_1-globulines (Fr 9 : 1.880 impul./min.) que dans les α_2-globulines (Fr : 880 impul./min.). Ses résultats montrent que l'insuline — I^{131} migre entre les α_2 et les α_1-globulines.

La différence constatée entre la migration électrophorétique de l'insuline cristallisée de bœuf, localisée avec les α_2-globulines et celle de l'insuline de bœuf marquée par l'Iode 131, localisée entre les α_2 et les α_1-globulines, provient probablement de l'utilisation de solutions tampons différentes.

Nous avons encore entrepris l'étude de la variation de l'activité insulinique des fractions sériques d'un sérum d'un individu à jeun, après adjonction d'insuline cristallisée et d'antisérum anti-insuline de bœuf préparé chez le cochon d'Inde (tableau VII).

TABLEAU VII. - **Variation de l'activité insulinique des fractions protéiniques du sérum d'individu ayant un métabolisme normal, après addition « in vitro » d'insuline de bœuf cristallisée et d'antisérum anti-insuline de bœuf.**

Fraction protéinique		γ-globuline	β-globuline	α_2-globuline	α_1-globuline-albumine
Activité insulinique des fractions protéiniques (μU/ml de sérum fract. dil. 1:2)	Fractions protéiniques ..	160	880	50	320
	+ antisérum (0,01 ml/ml).	45	35	10	10
	+ insuline cristallisée (500 μU/ml).	620	1.350	490	800

Nous constatons que les 500 μU/ml d'insuline cristallisée ajoutés aux différentes fractions protéiniques après la séparation sont retrouvées par dosage de l'activité insulinique. Cette expérience montre que les fractions protéiniques de sérums d'individus ayant un métabolisme normal ne contiennent pas de facteurs inhibant l'insuline ajoutée *in vitro*.

D'autre part, après l'adjonction de 0,01 ml d'anti-sérum anti-insuline de bœuf par ml de fraction protéinique, nous ne trouvons plus aucune activité insulinique dans les α_2 et les α_1-globulines-albumines, tandis qu'une faible activité insulinique subsiste dans les γ et les β-globulines.

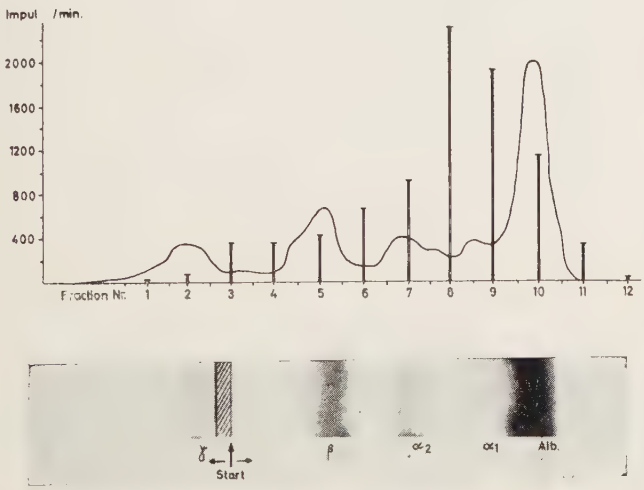


FIG. 5. - Radioactivité (Imp./mn.) des différentes fractions protéiniques après séparation par électrophorèse préparative d'un sérum avec addition d'insuline radioactive marquée au I^{131} (0,02 μC/ml ; activ. spéc. 400 μC/U) et courbe d'extinction de l'empreinte colorée sur papier filtre.

Fraction Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sérum R.C. (Imp./min.)	0	0	240	410	510	640	890	2.220	2.050	1.090	260	0
Sérum H.D. (Imp./min.)	0	240	480	420	540	740	960	2.440	1.980	1.360	360	80
Sérum M.R. (Imp./min.)	0	30	410	250	210	570	780	2.130	1.630	950	280	30
Moyenne (Imp./min.)	0	90	370	360	420	650	880	2.260	1.880	1.100	300	40

Ces résultats montrent que l'insuline est bien responsable de l'activité insulinique dosée dans ces fractions protéiniques, puisqu'un antisérum spécifique est capable d'inhiber son action. La faible activité insulinique persistant dans les γ et les β-globulines provient probablement du fait que l'insuline de ces 2 fractions se trouve sous une forme que l'antisérum ne peut pas entièrement neutraliser.

Notre dernière expérience a pour but la comparaison des résultats des deux méthodes de dosage biologique de l'insuline : l'une utilisant le métabolisme glucidique du tissu graisseux épididymaire du rat, et l'autre le métabolisme glucidique de son diaphragme.

Nous avons testé simultanément un « pool » de 7 fractions de β-globulines et un « pool » de 7 fractions de α_1-globulines-albumines provenant de la séparation du sérum prélevé sur 7 individus, trois heures après absorption d'un léger repas équivalent à 50 g d'H de C (tableau VIII).

Par la méthode utilisant le tissu graisseux du rat, nous trouvons une activité insulinique de 100 $\pm$ 25 μU/ml pour les β-globulines et de 110 $\pm$ 24 μU/ml pour les α_1-globulines-albumines, tandis que par la méthode utilisant le diaphragme du rat nous trouvons une absorption nette de glucose de 10,8 $\pm$ 28,5 par mg de diaphragme sec pour les β-globulines et de 33,8 $\pm$ 14,6 pour les α_1-globulines-albumines.

TABLEAU VIII. — **Comparaison de l'activité insulinique des β-globulines et des α_1-globulines-albumines de 7 sérums d'individus ayant un métabolisme normal, le dosage de l'activité insulinique étant effectué au moyen : A) du tissu graisseux du rat ; B) du diaphragme du rat.**

Fractions protéiniques	A) Tissu graisseux μU/ml de sérum dil. 1:2	N	B) Diaphragme Absorption nette de gl. γ/mg de diaphr. sec	N
7 fractions de β-glob.	+ 100 $\pm$ 25	8	— 10,8 $\pm$ 28,5	8
7 fractions α_1-glob.-alb.	+ 110 $\pm$ 24	8	+ 33,8 $\pm$ 14,6	8

N = nombre de déterminations

Ces résultats montrent que les β-globulines ont une action insulinique stimulant le métabolisme glucidique du tissu graisseux du rat, tandis que cette action n'est pas constatée sur le métabolisme du diaphragme du rat.

Cette différence d'action des β-globulines sur le métabolisme du tissu graisseux et sur celui du rat n'est pas constatée avec les α_1-globulines-albumines qui ont une action insulinique aussi bien sur le tissu graisseux que sur le diaphragme.

DISCUSSION

Les protéines sanguines étant amphotères, elles possèdent une charge électrique variable suivant le pH de la solution où elles se trouvent et leur point isoélectrique. Par conséquent, dans un champ électrique, elles présentent une migration plus ou moins rapide vers l'anode ou la cathode suivant la valeur de cette charge électrique. C'est sur ces propriétés que reposent les diverses méthodes d'électrophorèse pour la séparation des protéines sanguines. Plus la charge nette des protéines et le champ électrique sont élevés, plus leur migration électrophorétique est rapide. Cette charge nette dépend de la composition et de la force ionique de la solution tampon, ainsi que de la grosseur et de la forme des molécules protéiniques. En effet, les électrolytes de la solution tampon entourent les molécules protéiniques et leur charge vient ainsi diminuer la charge électrique propre de la protéine. En milieu alcalin, la charge nette des protéines est négative et leur migration se fait vers l'anode (40).

La technique d'électrophorèse de Tiselius (34) permet la séparation des protéines sériques en six fractions : les γ-globulines, les β_1 et β_2-globulines, les α_1 et α_2-globulines et les albumines. Ce procédé d'électrophorèse selon Tiselius ne se prête pas, à la suite des mouvements de convection des protéines, à l'isolement des diverses fractions protéiniques séparées. Il est nécessaire de stabiliser le milieu de séparation par l'adjonction à la solution tampon d'un milieu de support, si l'on veut parvenir à isoler ces diverses fractions protéiniques. Cette idée a permis le développement de différents procédés de séparation par électrophorèse dite « de zone » (14, 15, 17, 18, 23, 25, 26, 29). Comme milieu de support, on utilise actuellement non seulement des bandes de papier filtre, employées très couramment en clinique pour les électrophorèses sur papier, mais aussi quantité d'autres substances, telles que : la laine de verre, la poudre de verre, la poudre de papier, l'Agar, l'amidon, etc... Les désavantages des électrophorèses de zone résident dans deux phénomènes : *l'endosmose* et *l'adsorption* des protéines au milieu de support. *L'endosmose* est occasionnée par la liaison des ions de la solution tampon au milieu de support qui prend ainsi une charge électrique négative en milieu alcalin. Il s'ensuit un courant endosmotique de solution tampon vers la cathode, qui va à l'encontre de la migration anodique des protéines. Les γ-globulines se trouvent ainsi entraînées plus ou moins loin vers la cathode.

Alors que *l'endosmose* ne nuit pas considérablement à la séparation du sérum, *l'adsorption* des protéines au milieu de support peut jouer un rôle nettement plus défavorable. Les protéines qui migrent à travers les pores du milieu sont adsorbées tout au long de leur migration, ce qui perturbe la séparation et rend ainsi impossible la localisation précise de certaines substances et leur dosage. Nous avons l'exemple de la cellulose qui, utilisée comme milieu de support pour la séparation du sérum par électrophorèse de zone, ne permet pas la localisation ni le dosage de l'activité insulinique dans les fractions protéiniques, vu l'adsorption de la molécule d'insuline à la cellulose (10, 22).

Pour nos séparations par électrophorèse de zone, nous avons utilisé comme milieu de support une poudre synthétique hydrophile : le chlorure de polyvinyle. Nous avons pu reconnaître, à l'aide d'insuline marquée à l'Iode 131, que cette poudre n'adsorbait pas l'insuline.

Elle présente en outre l'avantage d'être tout à fait inerte vis-à-vis des bases et des acides et de pouvoir être réutilisée, après avoir été lavée plusieurs fois à l'eau distillée. Heide et coll. utilisent avec succès la même poudre pour la séparation des protéines sériques et le dosage des hydrates de carbone des γ-globulines (21).

Nous avons effectué nos séparations au moyen d'une solution tampon bicarbonatée ayant un pH de 7,6-7,8. Le choix de ce tampon physiologique permet de doser l'activité biologique de l'insuline sans avoir recours à une dialyse préalable des fractions, comme on est obligé de le faire avec l'utilisation d'autres tampons. Le pH de 7,6-7,8 permet en outre une excellente conservation de l'activité insulinique.

Pour éviter la dénaturation de l'insuline, la surface supérieure et inférieure du bloc de chlorure de polyvinyle est refroidie de façon à ce que la température ne dépasse pas 5 degrés. Ainsi, la durée de la séparation du sérum peut se prolonger sans danger pendant une période de 22 à 24 heures.

L'empreinte colorée de l'électrophorèse et sa courbe d'extinction permettent de distinguer 4 fractions protéiniques, qui représentent successivement les γ, β, α_2-globulines et les α_1-globulines-albumines (fig. 2). L'électrophorèse sur papier de chacune de ces fractions montre que les α_1-globulines et les albumines se trouvent mélangées dans la même fraction. La séparation de ces deux protéines n'est obtenue que lorsqu'on utilise un tampon de Michaelis ayant un pH de 8,6 (fig. 5).

Dans la littérature, les auteurs qui ont effectué des séparations de sérums pour localiser l'insuline, ont utilisé le plus souvent soit l'électrophorèse en colonne, soit un procédé d'électrophorèse horizontale très semblable au nôtre (8, 9, 16, 31, 32, 33, 37). Quelques auteurs seulement utilisent un tampon bicarbonaté de Krebs-Ringer (9, 37). Comme milieu de support pour leurs électrophorèses, ces auteurs utilisent soit l'amidon, soit une cellulose modifiée chimiquement pour éviter l'adsorption de l'insuline. Les résultats de leur séparation de sérum sont semblables aux nôtres. Ils éprouvent la même difficulté à séparer les α_1-globulines des albumines, séparation qu'ils ne parviennent également à réaliser qu'avec un tampon de Michaelis.

Après la séparation par électrophorèse d'un sérum en 4 fractions, celles-ci sont éluées, puis lyophilisées. Avant le dosage de leur activité insulinique, le produit de chaque fraction lyophilisée est dissous avec une quantité de tampon bicarbonaté de Krebs-Ringer telle que la concentration des protéines soit équivalente à la moitié de la concentration du sérum original.

Le sérum de 10 individus jeunes ayant un métabolisme normal a été prélevé 3 heures après le petit déjeuner car, d'après nos recherches précédentes (13), nous avions déterminé qu'à ce moment, l'activité insulinique du sérum dilué 1 : 2 était équivalente à environ 300 à 500 μU/ml, valeurs que nous avons jugées optimales pour la détermination de l'activité insulinique de nos fractions protéiniques. En effet, lors de la séparation de sérums provenant d'individus à jeun depuis 12 heures, nous avions trouvé une activité insulinique parfois très basse, ayant en moyenne 170 ± 122 μU/ml.

La séparation de ces 10 sérums et les résultats des dosages de leurs fractions au moyen du tissu graisseux du rat nous ont montré une forte activité insulinique des γ et β-globulines, ainsi que des α_1-globulines et albumines, alors que les α_2-globulines ne présentaient qu'une activité insulinique très faible (fig. 3 A et 4 A).

Randle et Taylor (31, 33) obtiennent la même distribution de l'activité insulinique après fractionnement du sérum humain et de bœuf. Ces auteurs utilisent l'électrophorèse en colonne, et déterminent l'activité insulinique au moyen du diaphragme de rat. En subdivisant les fractions protéiniques, ils parviennent même à localiser l'activité insulinique dans la partie des albumines migrant le plus lentement (31). Willebrands (37) sépare le sérum de patients diabétiques avec un procédé très semblable au nôtre et détermine l'activité insulinique avec le diaphragme du rat. Il trouve également que l'activité insulinique se localise dans les γ et β-globulines, mais dans un cas seulement dans les α_1-globulines-albumines. Beigelman (8) constate aussi que l'effet hypoglycémiant le plus fort est provoqué par l'injection de β-globulines de sérum humain chez la souris.

Si les résultats de la *distribution* de l'activité insulinique dans les fractions électrophorétiques du sérum semblent concordants, il n'en est pas de même pour les valeurs *quantitatives* de ces fractions. L'effet des gamma- et bêta-globulines sur le métabolisme du diaphragme de rat constaté par Randle et Taylor (31, 33) est plus petit que celui des albumines du même sérum. Par contre, nous trouvons dans les bêta-globulines des 10 sérums que nous avons étudiés la plus forte activité insulinique, soit 763 ± 303 μU/ml de sérum dilué 1 : 2. Dans les gamma-globulines et dans les alpha-1-globulines-albumines, nous trouvons une activité insulinique plus petite de 318 ± 192 pour les gamma-globulines, et de 353 ± 153 μU/ml pour les alpha-1-globulines-albumines. La différence de ces valeurs avec les bêta-globulines est statistiquement significative ($p < 0{,}001$). Les gamma- et bêta-globulines sont responsables du 73 % de l'activité insulinique totale, alors que les alpha-1-globulines et albumines ne représentent que 24 % de cette activité. La fraction des alpha-2-globulines ne contient que de petites quantités, non significatives, d'insuline, soit 53 ± 68 μU/ml (3 %). Dans les fractions des alpha-2-globulines de 2 sérums seulement, nous avons trouvé des taux importants d'activité insulinique, soit 135 et 215 μU/ml. Ces hautes valeurs sont dues vraisemblablement à une mauvaise séparation des alpha-2-globulines et des albumines et sont à l'origine des importantes variations de l'écart standard de la moyenne de l'activité insulinique des alpha-2-globulines. Randle et Taylor n'ont donc pas obtenu les mêmes résultats quantitatifs de l'activité insulinique de leurs fractions protéiniques. Cette différence réside vraisemblablement dans l'emploi de méthodes

différentes pour le dosage de l'activité insulinique. Nous reviendrons d'ailleurs plus loin sur ce problème.

La somme de l'activité insulinique des 4 fractions protéiniques des sérums séparés s'élève à 1.488 ± 788 μU/ml. Ce résultat est 3 à 5 fois plus élevé que les valeurs obtenues par dosage d'une série de sérums non fractionnés prélevés dans les mêmes conditions. Cette augmentation de l'activité insulinique que nous avons constatée après la séparation des sérums n'a aucune explication tout à fait certaine.

Elle pourrait être causée par l'adsorption au milieu électrophorétique de substances inhibant l'activité insulinique, ou encore par la destruction de ces substances par les diverses manipulations imposées au sérum lors de son fractionnement. L'absence de facteurs inhibiteurs de l'insuline dans nos fractions albuminiques, comme nous l'avons montré par l'adjonction d'insuline cristallisée (tableau VII), parlerait en faveur de cette hypothèse.

Vallance-Owen et coll. (36) ont trouvé dans la fraction albuminique du sérum d'individus ayant un métabolisme normal un facteur inhibant l'activité de l'insuline cristallisée. Cependant, d'après les travaux récents de Lowy et coll., il existe un doute sur l'efficacité de ce facteur sur le tissu graisseux du rat. Ce facteur inhibant ne serait actif que sur le diaphragme de rat (27).

Cette très haute activité insulinique du sérum après son fractionnement pourrait d'autre part être consécutive à la libération de l'insuline par rupture d'une liaison inactivatrice à la suite des diverses opérations que l'on fait subir au sérum pour son fractionnement.

Cette hypothèse est avancée à la suite de la description d'Antoniades et de Gundersen de l'existence de complexes insuline-protéine inactifs sur le diaphragme de rat et moins actifs sur le tissu graisseux que l'insuline libre (1, 2, 4).

Il a déjà été souvent constaté que la dilution du sérum par une solution tampon avant son dosage avait pour conséquence une augmentation de son activité insulinique. Ce phénomène de dilution, resté sans explication, est encore à prendre en considération à ce sujet (38).

Après addition au sérum d'insuline marquée à l'Iode 131, nous constatons un sommet de radioactivité entre les alpha-2- et les alpha-1-globulines (fig. 5). D'autre part, l'insuline exogène ajoutée au sérum migre avec les alpha-1-globulines d'après des expériences faites par divers auteurs, aussi bien par électrophorèse sur papier que par électrophorèse préparative de zone (10, 22). Ces résultats ont encore été confirmés par Randle et Taylor, qui ont trouvé que l'insuline non marquée, aussi bien que l'insuline-Iode 131, migrait avec les alpha-1-globulines (31).

Cette recherche, que nous avons entreprise avec des quantités très réduites d'insuline-I^{131} (50 μU/ml), a permis en outre de constater une très faible adsorption de la molécule d'insuline au milieu électrophorétique.

L'activité biologique de l'insuline cristallisée (1.000 μU/ml) ajoutée à 8 des 10 sérums déjà étudiés, avant la séparation par électrophorèse préparative, se trouve localisée avec les alpha-2-globulines, sans que les autres fractions ne subissent une augmentation significative de leur activité insulinique. L'activité insulinique de la fraction des alpha-2-globulines augmente ainsi de 53 ± 68 μU/ml à 930 ± 386 μU/ml. La perte d'insuline ne s'élève, malgré les très nombreuses opérations de la séparation, qu'à 10 % environ. La faible différence observée dans la localisation de l'activité insulinique de l'insuline cristallisée et dans celle de la radioactivité de la même insuline marquée par l'Iode 131 est vraisemblablement due à l'utilisation de solutions tampons différentes pour le fractionnement des sérums.

Pour juger de la spécificité de l'activité insulinique mesurée par le métabolisme glucidique du tissu graisseux du rat, nous avons effectué des dosages, après adjonction d'antisérum anti-insuline. Nous avons pu constater que l'addition de très petites quantités d'antisérum provoquait la neutralisation de l'activité insulinique, aussi bien des fractions protéiniques d'un sérum séparé, que celle de l'insuline cristallisée (tableau VII). Il persiste cependant dans les gamma- et bêta-globulines, après l'addition de l'antisérum, une faible activité insulinique de 45 et 35 μU/ml. Cette activité persistant après l'action de l'antisérum ne peut vraisemblablement pas être neutralisée par cet antisérum. La molécule d'insuline dans ces deux fractions protéiniques se trouve probablement sous une forme de complexe avec une protéine. Cette insuline « liée », suivant les observations de Ramseier et coll. (30) ne peut pas être neutralisée par un anticorps. Il existe varisemblablement de grosses différences entre les antisérums utilisés, car, dans nos expériences, la plus grande partie de l'activité insulinique localisée dans les bêta- et gamma-globulines peut être neutralisée avec l'antisérum que nous avons employé.

A la suite d'une absorption de 100 g de glucose, on constate une grande variation des taux de l'activité insulinique dans les différentes fractions sériques. L'activité insulinique des albumines s'élève de 24 % à 48 % de l'activité insulinique totale, tandis que celle des gamma-globulines reste inchangée et que celle des bêta-globulines diminue de 52 % à 24 %. Ces variations sont encore plus frappantes lorsqu'elles sont exprimées en valeur absolue. L'activité insulinique totale subit, après l'absorption de glucose, une élévation de 2.100 μU/ml. L'augmentation de la fraction des albumines est de 1.400 μU/ml, tandis que celle des gamma- et bêta-globulines ensemble n'est que de 400 μU/ml, augmentation qui n'est pas statistiquement significative. On constate également dans les alpha-2-globulines une augmentation de plus de 200 μU/ml.

Antoniades et Gundersen (1, 4, 5, 6) ont montré, avec l'aide de résine à échange d'ions, que l'insuline se trouve vraisemblablement dans le sang sous 2 formes différentes : une forme « libre » et une forme « liée » à une protéine fortement basique. Après une absorption de glucose déterminant une élévation de la glycémie,

ces auteurs trouvent une augmentation de la forme « libre » de l'insuline, en même temps qu'une diminution de la forme « liée ». Ils déduisent de ces résultats qu'il se produit une dissociation de la liaison de l'insuline « liée » à la suite de l'augmentation du glucose sanguin.

Dans nos recherches, nous avons vu une très forte augmentation, après l'absorption de glucose, de l'activité insulinique dans les albumines, mais sans constater de diminution simultanée dans les gamma- et bêta-globulines.

L'activité insulinique que nous avons trouvée dans les alpha-1-globulines-albumines pourrait être attribuée à l'insuline « libre », tandis que l'activité insulinique des gamma- et bêta-globulines serait imputable à l'insuline « liée ». La distinction entre ces 2 formes d'insuline peut être mise en évidence par leur action différente sur le métabolisme du muscle et du tissu graisseux, comme l'ont montré Antoniades et Gundersen (1, 4). Alors que l'absorption du glucose par le diaphragme isolé n'est activée que par l'insuline « libre », le métabolisme du tissu graisseux, lui, est activé aussi bien par la forme libre de l'insuline que par sa forme liée, qui cependant ne semblerait que partiellement utilisée (2).

Les recherches que nous avons entreprises en comparant les résultats de l'activité d'un « pool » de fractions de bêta-globulines et d'un « pool » de fractions d'albumines sur le métabolisme du tissu graisseux et sur celui du diaphragme de rat montrent clairement la différence d'action de ces 2 fractions protéiniques. Les 2 fractions ont une activité insulinique dans ce cas de même valeur sur le tissu graisseux (100 et 110 μU/ml), tandis que sur le diaphragme, la fraction des albumines détermine une augmentation de l'absorption nette du glucose de 33.8 γ/10 mg de diaphragme sec et la fraction des bêta-globulines ne cause aucune variation de cette absorption (tableau VIII). Donc, l'activité insulinique des gamma- et bêta-globulines correspondrait effectivement à l'insuline « liée » et l'activité insulinique des albumines représenterait l'insuline « libre ».

Dans une récente communication, ces mêmes auteurs (7) font allusion à une constatation semblable, faite à la suite de l'étude de fractions protéiniques séparées par électrophorèse de zone, sans cependant donner les résultats détaillés de leurs recherches.

Ces constatations permettent d'expliquer la différence de la répartition de l'insuline dans les différentes fractions protéiniques observée entre les résultats de Randle et Taylor (31) et nos résultats. Nos dosages d'insuline sont obtenus par la méthode du tissu graisseux, exprimant l'activité insulinique aussi bien de l'insuline « libre » que de l'insuline « liée », tandis que ceux de Randle et Taylor sont réalisés par la méthode utilisant le diaphragme et expriment ainsi seulement l'activité insulinique de l'insuline « libre ».

Nous venons de voir, qu'à l'inverse des résultats d'Antoniades et coll., nous ne trouvons pas une diminution mais une légère augmentation de l'activité insulinique des gamma- et des bêta-globulines en réponse à une stimulation par absorption de glucose. Cette élévation de l'activité insulinique de ces 2 fractions pourrait être consécutive à la sécrétion du pancréas. Selon Antoniades et coll. (3), le pancréas sécrète l'insuline sous sa forme « libre », mais, peu après, elle est retrouvée dans le sang périphérique sous sa forme « liée » dans une proportion plus ou moins importante suivant l'état métabolique du sujet. Nos résultats ne sont pas incompatibles avec l'existence d'un mécanisme périphérique de dissociation de l'insuline « liée », invoqué également par cet auteur ; au contraire, la très forte augmentation de l'insuline « libre » en comparaison de celle, très faible, de l'insuline « liée » après une épreuve d'hyperglycémie, est propre à soutenir l'hypothèse de l'existence d'un tel mécanisme.

Actuellement, il semble très difficile d'apprécier le rôle que jouent respectivement dans la régulation de l'insuline : le pancréas, le foie, et ce mécanisme périphérique de dissociation de l'insuline « liée ».

L'insuline de bœuf cristallisée ajoutée au sérum avant la séparation migre par électrophorèse avec les alpha-2-globulines. Selon Antoniades et coll. (1), il s'agit d'une insuline « libre » qui n'est pas adsorbable dans une résine à échange d'ions. Nous avons par contre trouvé que l'insuline « libre » endogène du sérum humain a la même vitesse de migration que les alpha-1-globulines-albumines. Cette différence de migration électrophorétique entre l'insuline cristallisée de bœuf et l'insuline endogène humaine ne semble pas pouvoir être expliquée par la faible différence dans la chaîne des acides aminés de l'insuline humaine et de bœuf ; mais il est très probable que l'insuline cristallisée obtenue par extraction du pancréas n'est pas identique à l'insuline circulant dans le sang (*).

(*) Nous remercions de leur collaboration nos collègues et les laborantines du laboratoire d'endocrinologie clinique de la 1re clinique universitaire de médecine de Francfort-sur-le-Main, sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible.

RÉSUMÉ

L'activité insulinique des fractions protéiniques, séparées par électrophorèse de zone, de sérums d'individus ayant un métabolisme normal a été mesurée par la méthode biologique se basant sur l'oxydation du glucose-1-C^{14} par la graisse épididymaire du rat.

Ces dosages, effectués dans trois conditions différentes, ont donné les résultats suivants : 1) trois heures après le petit déjeuner, l'activité insulinique se localise surtout dans la fraction des γ-β-globulines (73 %) et dans celle des α_1-globulines-albumines (24 %). 2) trente minutes après l'absorption de 100 gr de glucose, on constate une très forte augmentation de l'activité insulinique dans les α_1-globulines-albumines, tandis que l'augmentation dans les γ-β-globulines n'est pas statistiquement significative. 3) l'adjonction de 1.000 μU/ml d'insuline de bœuf avant la séparation entraine une augmentation significative d'activité insulinique de la fraction des α_2-globulines seulement. Une expérience parallèle réalisée après adjonction d'insuline-I^{131} montre un pic de radioactivité entre les α_1-globulines et les α_2-globulines.

Ces résultats suggérant l'existence de deux formes d'insuline, nous avons entrepris de comparer l'action de ces fractions sériques sur l'oxydation du glucose par le tissu adipeux et sur l'absorption du glucose par le diaphragme de rat. Cette expérience nous a permis de constater que les α_1-globulines-albumines ont une activité insulinique sur le tissu adipeux et sur le diaphragme, tandis que les β-globulines n'ont une activité insulinique que sur le tissu adipeux.

Ces résultats viennent soutenir l'hypothèse de l'existence de deux formes d'insuline, dont l'une serait « libre » et l'autre « liée » à une protéine sanguine.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANTONIADES H. N. — Studies on the state of insulin in blood, the state and transport of insulin in blood. *Endocrinology,* 1961, *68,* 7.
2. ANTONIADES H. N., BEIGELMAN P. M., TRANQUADA R. B., GUNDERSEN K. — Studies on the state of insulin in blood : « free » insulin and insulin complexes in human sera and their in vitro biological properties. *Endocrinology,* 1961, *69,* 46.
3. ANTONIADES H. N., BOUGAS J. A., PYLE H. M. — Studies on the state of insulin in blood (examination of splenic, portal and peripheral blood serum of diabetic and non-diabetic subjects for « free » insulin and insulin complexes). *New Engl. J. Med.,* 1962, *267,* 218.
4. ANTONIADES H. N., GUNDERSEN K. — Studies on the state of insulin in blood : dissociation of purified human blood insulin complex (es) by incubation with adipose tissue extracts in vitro. *Endocrinology,* 1961, *68,* 36.
5. ANTONIADES H. N., GUNDERSEN K., BEIGELMAN P. M., PYLE H. M., BOUGAS J. A. — Studies on the state, transport and regulation of insulin in human blood. *Diabetes,* 1962, *11,* 261.
6. ANTONIADES H. N., GUNDERSEN K., PYLE H. M. — Studies on the state of insulin in blood : the role of glucose in the in vivo dissociation of insulin complexes. *Endocrinology,* 1961, *69,* 163.
7. ANTONIADES H. N., GUNDERSEN K., PYLE H. M. — Transport and regulation of insulin activity in blood. IVe Congrès de la fédération internationale du diabète, 1961, éd. Méd. et Hyg. (Genève), p. 638.
8. BEIGELMAN P. M. — Insulin activity of serum protein fractions. *Diabetes,* 1958, *7,* 365.
9. BOLINGER R E., v. d. GELD H., WILLEBRANDS A. F. — Electrophoretic separation of insulin activity of normal plasma and plasma with added insulin I^{131}. *Metabolism,* 1959, *8,* 39.
10. DITSCHUNEIT H. — Insulinresistenz und Insulinantikörper Vortrag und Demonstrationsabend der I. medizinischen Universitätsklinik Ffm. Sitzung, 7-11-62. *Klin. Wschr.,* 1962, *40,* 609.
11. DITSCHUNEIT H., CHANG-SU AHN, PFEIFFER M., PFEIFFER E. F. — Über die Besimmung von Insulin im Blut am epididymalen Fetthang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose. *Klin. Wschr.,* 1959, *37,* 1239.
12. DITSCHUNEIT H., FAULHABER J.-D., PFEIFFER E. F. — Verbesserung der Methode zur Bestimmung von Insulin im Blut mit Hilfe radioaktiver 1-C^{14}-Glucose und dem epididymalen Rattenfettgewebe. *Atompraxis,* 1962, *8,* 172.
13. DITSCHUNEIT H., MUELLER-RUCHHOLZ W., PFEIFFER E. F. — Further studies on the insulin stimulating action of sulfonylureas. *Diabetes* (in press).
14. DURRUM E. L. — A microelectrophoretic and microionophoretic technique. *J. Amer. Chem. Soc.,* 1950, *72,* 2943.
15. DURRUM E. I., PAUL M. H., SMITH E. R. B. — Lipid detection in paper electrophoresis. *Science,* 1952, *116,* 428.
16. FIELD J. B., TIETZE F., STETTEN D. — Further characterization of an insulin antagonist in the serum of patients in diabetic acidosis. *J. Clin. Invest.,* 1957, *36,* 1588.
17. GRASSMANN W. — Neue Verfahren der Elektrophorese auf dem Eiweissgebiet. *Naturwissenschaften,* 1951, *38,* 200.
18. GRASSMANN W., HANNIG K. — Ein einfaches Verfahren zur kontinuerlichen Trennung von Stoffgemischen auf Filterpapier durch Elektrophorese. *Naturwissenschaften,* 1950, *37,* 397.
19. GRASSMANN W., HANNIG K. — Beiträge zur Methodik der papierelektrophoretischen Serumanalyse. *Klin. Wschr.,* 1954, *32,* 838.
20. HAGEN J. M., BAK E. G., COOPER O. — Studies on the metabolism of adipose tissue. *J. biol. Chem.,* 1959, *234,* 781.
21. HEIDE K., HAUPT H., SCHMIDTBERGER R. — Über den Kohlenhydratgehalt von Proteinen des menschlischen gamma-Globulinkomponentensystems. *Behringwerkmitteilungen,* Mitt., 1959, *37,* 29.
22. KALLEE E. — Über 131 I-signiertes Insulin (Anwendungsbereich und Grenzen der Nachweismethode). *Klin. Wschr.,* 1954, *32,* 508.
23. KUNKEL H. G. — In « Methods of biochemical analysis », 1954, Glick ed., N.Y., Interscience, *1,* 141.
24. KUNKEL H. G., SLATER R. J. — Zone electrophoresis in a starch supporting medium. *Proc. Soc. exp. Biol.* (N.Y.), 1952, *80,* 42.
25. KUNKEL H. G., TISELIUS A. — Electrophoresis of proteins on filter paper. *J. gen. Physiol.,* 1951, *35,* 89.
26. KUNKEL H. G., TRAUTMANN R. — *In* « Electrophoresis », 1959, M. Bier ed., Acad. Press, N.Y.
27. LOWY C., BLANSHARD G., PHEAR D. — Antagonism of insulin by albumin. *Lancet,* 1961, *1,* 802.
28. MARTIN D. B., RENOLD A. E., DAGENAIS Y. M. — An assay for insuline-like activity using rat adipose tissue. *Lancet,* 1958, *11,* 76.
29. MISTEIN S. W. — Oxydation of specifically labeled glucose by rat adipose tissue. *Proc. Soc. exp. Biol.* (N.Y.), 1956, *92,* 632.
30. RAMSEIER E. B., FROESCH E. R., BALLY P., LABHART A. — Serum-Insulinbestimmung am Fettgewebe in vitro : Beeinflussung durch andere Hormone, « freie » und « gebundete » Insulinaktivität. IVe congrès de la fédération internationale du diabète, 1961, éd. Méd. et Hyg., Genève, p. 643.
31. RANDLE P. J., TAYLOR K. W. — The insulin activity of protein fractions of normal human serum. *J. Endocr.,* 1958, *17,* 387.
32. SEHON A. H., KAYE M., MCGARRY E., ROSE B. — Localization of an insulin-neutralizing factor by zone electrophoresis in a serum of an insulin resistant patient. *J. Lab. clin. Med.,* 1955, *45,* 765.
33. TAYLOR K. W., RANDLE P. J. — The effect of insulin antiserum on the insulinactivity of serum and protein fractions of serum. *J. Endocr.,* 1959, *19,* 221.
34. TISELIUS A. — A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixture. *Trans. Farad. Soc.,* 1937, *33,* 524.
35. VALLANCE-OWEN J., HURLOCK B. — Estimation of plasma-insulin by the rat diaphragma method. *Lancet,* 1954, *1,* 68.
36. VALLANCE-OWEN J., LILLEY M. D. — An insulin antagonist associated with plasma-albumin. *Lancet,* 1961, *1,* 804.
37. WILLEBRANDS A. F. — Serum insulin and anti-insulin activity in diabetic acidosis. *Clin. chim. Acta,* 1960, *5,* 508.
38. WILLEBRANDS A. F., v. d. GELD H., GROEN J. — Determination of serum insulin using the isolated rat diaphragma. The effect of serum dilution. *Diabetes,* 1958, *7,* 119.
39. WINEGRAD A. T., RENOLD A. E. — Studies on rat adipose tissue in vitro. — I. Effects of insulin on the metabolism of glucose, pyruvate and acetate. *J. biol. Chem.,* 1958, *233,* 267.
40. WUEHRMANN F., WUNDERLY Ch. — Die Bluteiweisskörper des Menschen, 1947, Bruno Schwabe, Basel.
41. WUNDERLY Ch. — Die Papierelektrophorese, 1959, *2.* Heft, Aarau, Schweiz.

LANGRES. — IMPRIMERIE DE CHAMPAGNE.

N° d'ordre 24.141.